SNI

STANDAR NASIONAL INDONESIA

SNI 01 - 3136 - 1992

UDC 664.38 : 636.08

PROTEIN SEL TUNGGAL UNTUK PAKAN

DEWAN STANDARDISASI NASIONAL - DSN

DAFTAR ISI

PROTEIN SEL TUNGGAL
UNTUK PAKAN

1. RUANG LINGKUP

Standar ini meliputi definisi, syarat mutu, cara pengambilan contoh, cara uji, syarat penandaan, dan cara pengemasan Protein Sel Tunggal untuk pakan.

2. DEFINISI

Protein sel tunggal untuk pakan adalah produk kering yang dibuat dengan cara membiakkan jasad renik tertentu dalam substrat tertentu, dan dipergunakan sebagai sumber protein dalam pakan.

3. SYARAT MUTU

No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1.	Air	% b/b	maks. 10
2.	Protein (N X 6.25)	% b/b	min. 40
3.	Abu	% b/b	maks. 9
4.	Serat kasar	% b/b	maks. 3
5.	Cemaran mikroba		
	5.1 Angka lempeng total	kol/gram	maks. $7,5 \times 10^3$
	5.2 Kapang	kol/gram	maks. 50
	5.3 Salmonela		negatif/25 gram

4. CARA PENGAMBILAN CONTOH

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI. 19—0428--1989. *Petunjuk Pengambilan Contoh Padatan.*

5. CARA UJI

5.1 Persiapan Contoh

Ambil contoh dengan sistem diagonal, kumpulkan sehingga diperoleh contoh yang homogen, kemudian bagi menjadi empat bagian yang sama. Ambil dua bagian yang saling berhadapan, kemudian bagi empat lagi dan selanjutnya lakukan seperti pengerjaan di atas sehingga diperoleh jumlah yang cukup untuk analisis. Apabila bentuk contoh tidak halus, giling contoh tersebut hingga halus.

5.2 Air

5.2.1 Prinsip

Kehilangan bobot pada pemanasan 105°C dianggap sebagai kadar air yang terdapat pada contoh.

5.2.2 Peralatan

a. Botol timbang bertutup
b. Eksikator
c. Oven
d. Neraca analitik

5.2.3 Cara Kerja

a. Timbang seksama 1 – 2 g cuplikan pada sebuah botol timbang bertutup yang sudah diketahui bobotnya.

b. Keringkan pada oven suhu 105°C selama 3 jam.

c. Dinginkan dalam eksikator.

d. Timbang, ulangi pekerjaan ini hingga diperoleh bobot tetap.

Perhitungan :

$$\text{Kadar air} = \frac{b}{a} \times 100\%$$

a = bobot cuplikan sebelum dikeringkan, dalam gram.
b = kehilangan bobot setelah dikeringkan, dalam gram.

5.3 Protein

5.3.1 Prinsip

Senyawa nitrogen diubah menjadi amonium sulfat oleh H_2SO_4 pekat. Amonium sulfat yang terbentuk diuraikan dengan NaOH. Amoniak yang dibebaskan diikat dengan asam borat dan kemudian dititar dengan larutan asam standar.

5.3.2 Peralatan

a. Neraca analitik
b. Labu Kjeldhal 100 ml
c. Seperangkat alat dekstruksi
d. Seperangkat alat destilasi
e. Buret mikro

5.3.3 Pereaksi

a. Campuran selen yang terdiri dari 4 bagian selen, 3 bagian $CUSO_4.5H_2O$ dan 150 bagian Na_2SO_4 kering.

b. Larutan indikator
10 ml bromocresol green 0,1 % dicampur dengan 2 ml merah metil 0,1% dalam alkohol 95%.

c. Larutan asam borat indikator
500 ml asam borat 2% dicampur dengan 5 ml larutan indikator.

5.3.4 Cara kerja

a. Timbang dengan teliti 0,5 g cuplikan, masukkan ke dalam labu Kjeldhal 100 ml.

b. Tambahkan lebih kurang 2 g campuran selen dan 15 ml H_2SO_4 pekat teknis.

c. Panaskan di atas pemanas listrik atau nyala api pembakar sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan (sekitar 2 jam).

5.5.1 Prinsip

Ekstraksi contoh dengan asam dan basa untuk memisahkan serat kasar dari bahan lain.

5.5.2 Peralatan

a. Neraca analitik
b. Erlenmeyer 500 ml
c. Pemanas listrik
d. Pendingin
e. Corong Buchner
f. Oven
g. Botol timbang
h. Cawan porselen
i. Pompa vakum

5.5.3 Pereaksi

a. Larutan asam sulfat, H_2SO_4 1,25%
b. Larutan natrium hidroksida, NaOH 3,25%.
c. Etanol 96%
d. Kertas saring Whatman 54, atau 541.

5.5.4 Cara Kerja

a. Timbang 2 — 4 g cuplikan. Bebaskan lemaknya dengan cara ekstraksi dengan cara Soxlet atau dengan cara mengaduk, mengenap tuangkan contoh dalam pelarut organik sebanyak 3 kali. Keringkan contoh dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml.

b. Tambahkan 50 ml larutan H_2SO_4 1,25%, kemudian didihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak.

c. Tambahkan 50 ml NaOH 3,25% dan didihkan lagi selama 30 menit.

d. Dalam keadaan panas, saring dengan corong Buchner yang berisi kertas saring tak berabu Whatman 54 atau 541 yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya.

e. Cuci endapan yang terdapat pada kertas saring berturut-turut dengan H_2SO_4 1,25% panas, air panas dan etanol 96%.

f. Angkat kertas saring beserta isinya masukkan ke dalam kotak timbang yang telah diketahui bobotnya, keringkan pada suhu 105^oC, dinginkan dan timbang sampai bobot tetap.

g. Bila ternyata kadar serat kasar lebih besar dari 1%, abukan kertas saring beserta isinya, timbang sampai bobot tetap.

Perhitungan :

a. Serat kasar $\leqslant$ 1%

$$\% \text{ serat kasar} = \frac{a}{c} \times 100\%$$

b. Serat kasar $\geqslant$ 1%

$$\% \text{ serat kasar} = \frac{a - b}{c} \times 100\%$$

a = bobot endapan pada kertas saring, dalam gram.

b = bobot abu, dalam gram
c = bobot cuplikan, dalam gram.

Catatan :

1. Kehalusan partikel cuplikan harus diperhatikan, disarankan contoh yang halus tersebut dapat melalui ayakan yang berpori lebih kurang 1 mm^2.
2. Pembebasan lemak dari cuplikan dapat diabaikan bila jumlah lemak dalam cuplikan tersebut rendah.

5.6 Cemaran mikroba

5.6.1 Angka lempeng total (Metode "Pour Plate")

5.6.1.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam perbenihan yang cocok selama 24 — 48 jam pada suhu 35 ± 1°C.

5.6.1.2 Peralatan

a. Cawan petri dari gelas/plastik 0 (90 — 100 mm).
b. Pipet ukur (1,5 dan 10 ml)
c. Penangas air 45 ± 1°C
e. Alat penghitung koloni (colony counter).

5.6.1.3 Perbenihan dan Pengencer

a. Buffered Peptone Water (BPW)
b. Plate Count Agar (PCA)

5.6.1.4 Cara Kerja

a. Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti berikut: Timbang secara aseptik sepuluh atau 25 gram cuplikan (contoh) dan masukkan ke dalam 90 atau 225 ml Buffer Pepton Water (BPW) dalam botol atau labu. Kocok 25 kali atau blender pada kecepatan 15000 — 20000 rpm selama 2,5 menit (diperoleh pengenceran 1 : 10). Buat pengenceran berikutnya sesuai diperlukan dengan memipet 1 ml pengenceran 1 : 10 ke dalam 9 ml BPW dalam tabung (1 : 100), dst.
b. Pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran ke dalam cawan Petri steril secara simplo dan duplo.
c. Ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 — 15 ml media PCA (Plate Count Agar) yang telah dicairkan yang bersuhu 45 ± 1°C dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
d. Goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan perbenihan.
e. Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan perbenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
f. Biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku.
g. Masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram (inkubator) dan inkubasikan pada suhu 35 ± 1°C selama 24 48 jam.

h. Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan yang mengandung 25 — 250 koloni setelah 48 jam.

i. Hitung angka lempeng total dalam 1 gram contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan (sesuai).

5.6.1.5 Cara menghitung dan menyatakan hasil

a. Pilih cawan Petri (simplo dan duplo) dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 — 250 setiap cawan. Hitung semua koloni dalam cawan Petri dengan menggunakan alat penghitung koloni (colony sounter). Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per ml atau gram.

b. Jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar dari 250, hitung rata-rata jumlah koloni, kalikan dengan faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya.

c. Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 — 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran seperti yang disebut pada butir a dan b di atas, dan hitung rata-rata jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Jika jumlah yang tertinggi lebih besar dari dua kali jumlah yang terkecil, nyatakan jumlah yang lebih kecil sebagai jumlah bakteri per ml atau gram.

d. Jika rata-rata jumlah koloni masing-masing cawan Petri tidak terletak antara 25 dan 250 koloni, hitung jumlah koloni seperti pada butir a dan b di atas, dan nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per ml atau gram.

e. Jika jumlah koloni dari semua pengenceran lebih dari 250 koloni, maka setiap dua cawan Petri dengan pengenceran tertinggi dibagi ke dalam 2, 4 atau 8 sektor. Hitung jumlah koloni dalam satu bagian atau lebih. Untuk mendapatkan jumlah koloni dalam satu cawan Petri, hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pembagi dan pengenceran.
Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan per ml atau gram.

f. Jika dalam 1/8 bagian cawan Petri terdapat lebih dari 200 koloni, maka jumlah koloni yang didapat = 8 x 200 (1600), dikalikan dengan faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan per ml atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat (lebih besar dari 1600 x faktor pengenceran).

g. Jika tidak ada koloni yang tumbuh dalam cawan Petri, nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan pengenceran yang terendah (< 10).

h. Menghitung koloni perambat (Spreader).
Ada 3 macam perambatan pada koloni, yaitu :

(1) merupakan rantai yang tidak terpisah-pisah.
(2) perambatan yang terjadi di antara dasar cawan Petri dan perbenihan.
(3) perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan perbenihan.

Kalau terjadi hanya 1 (satu) perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap 1 (satu). Tetapi bila 1 atau lebih rantai terbentuk dan yang berasal dari sumber yang berpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai 1 (satu) koloni.

Bila (2) dan (3) terjadi maka sebaiknya pemeriksaan diulangi karena koloni dalam keadaan semacam ini agak sukar dihitung.

5.6.1.6 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka yang pertama dan kedua (dimulai dari kiri), sedangkan angka yang ketiga diganti dengan 0 apabila kurang dari 5 dan apabila 5 atau lebih dijadikan 1 yang ditambahkan pada angka yang kedua.

Contoh : 523.000 dilaporkan sebagai 520.000 ($5{,}2 \times 10^5$) 83.600 dilaporkan sebagai 84.000 ($8{,}4 \times 10^4$).

5.6.2 Kapang

5.6.2.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang cocok, setelah diinkubasikan pada suhu 25°C atau suhu kamar selama 5 hari.

5.6.2.2 Peralatan

a. Cawan Petri (100 x 15 mm)
b. Pipet ukur 1 ml dan 10 ml
c. Penangas air
d. Lemari pengeram 25°C atau suhu kamar
e. Alat penghitung koloni
f. Mikroskop.

5.6.2.3 Perbenihan

a. Peptone Dilution Fluid/Peptone Water.
b. PDA (Potato Dextrose Agar) atau perbenihan yang lainnya (Mycophil Malt agar) yang ditambah dengan antibiotik chlorotetracycline atau chloranphenicol atau streptomycine (250 ml perbenihan ditambah dengan 1 ml larutan 1 gram antibiotik dalam 100 ml air suling steril).

5.6.2.4 Cara Kerja

a. Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti (5.6.1.4a).
b. Pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran ke dalam cawan Petri steril secara simplo-duplo.
c. Tuangkan PDA yang telah dicairkan atau perbenihan lainnya (suhu 45 ± 1°C) sebanyak 15 — 20 ml ke dalam cawan Petri dan goyangkan cawan Petri sedemikian rupa sehingga campuran tersebar merata.
d. Setelah agar membeku, balikkan cawan Petri dan inkubasikan pada suhu 25°C atau suhu kamar selama 5 hari.
e. Hitung koloni kapang setelah 5 hari.
f. Laporkan/catat hasil sebagai jumlah kapang per gram atau ml contoh.

Keterangan :

1) Koloni kapang biasanya buram dan berbulu.
2) Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang.

5.6.3 Salmonella

5.6.3.1 Prinsip

Pertumbuhan Salmonella pada perbenihan selektir yang dilanjutkan dengan uji biokimia dan uji serologi.

5.6.3.2 Peralatan

a. Botol pengencer 500 ml
b. Tabung reaksi (18 mm x 180 mm)
c. Gelas ukur 100 ml
d. Pipet ukur 1 ml dan 10 ml
e. Cawan Petri 0 90 — 100 mm dan 0 140 — 150 mm
f. Gelas sediaan
g. Inkubator (lemari pengeram) suhu 37°C dan 42 — 43°C.
h. Pengering kabinet
i. Penangas air
j. Pengaduk gelas
k. Sengkelit (ose)
l. Alat sterilisasi filter (Seitz filter atau Millipore Membrane Filter).

5.6.3.3 Media dan Pereaksi

a. Bismuth Sulfite Agar (BSA)
b. Brilliant Green Agar (BGA)
c. Buffered Pepton Water (BPW)
d. Pereaksi Galaktosidase
e. Pereaksi indol dan perbenihan indol
f. Lysine Decarboxylation Medium (LDC)
g. Nutrient Agar
h. Saline Solution
i. Selenite Cystine Broth
j. Semi-Solid Nutrient Agar
k. Tetrathionate Brilliant Green Broth
l. Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)
m. Urea Agar atau Urea broth
n. MR—VP Medium
o. Salmonella Plyvalent O
p. Salmonella polyvalent H (Antisera Spicer Edwards)
q. XLD (Xylose Lysine Desoxycholate) Agar
r. SSA (Salmonella Shigella Agar)
s. HE agar (Hektoen Enteric Agar).

5.6.3.4 Cara Kerja

5.6.3.4.1 Penyiapan dan homogenisasi contoh

Lakukan homogenisasi contoh seperti berikut: Timbang secara aseptik 25 gram cuplikan (contoh) ke dalam 225 ml BPW, kocok 25 kali atau blender pada kecepatan 15000 — 20000 selama 2,5 menit.

5.6.3.4.2 Pra-pengkayaan (pre-enrichment)

a. Pindahkan contoh yang telah dihomogenisasi (5.6.1.4a) secara aseptik ke dalam botol 500 ml steril.
b. Inkubasikan pada 37°C ± 1°C selama 16 — 20 jam.

5.6.3.4.3 Pengkayaan (enrichment)

a. Pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan (5.6.3.4.2) ke dalam 100 ml Seletine Cystine Broth.
b. Inkubasikan pada suhu 35 — 37°C selama 24 jam.
c. Pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan (5.6.3.4.2) ke dalam 100 ml media Tertrathionate Brilliant Green Broth.

d. Inkubasikan pada suhu 43°C selama 24 jam.

5.6.3.4.4 Penanaman pada perbenihan pilihan

a. Pindahkan biakan pengkayaan (5.6.3.4.3) dengan cara menggoreskan masing-masing biakan dengan sengkelit ke dalam cawan Petri yang berisi BGA dan BSA atau perbenihan selektif lainnya (XLD, HE agar, SS agar).

b. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

c. Amati tersangka koloni Salmonella pada media dengan ciri-ciri sebagai berikut:

BGA : Koloni yang berwarna merah muda hingga merah atau bening hingga buram dengan lingkaran merah muda sampai merah.

BSA : Koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Warna media di sekitar koloni mula-mula coklat dan kemudian menjadi hitam jika masa inkubasi bertambah. Pada beberapa "strain" koloni berwarna hijau dengan daerah di sekelilingnya berwarna lebih gelap.

XLD : Koloni berwarna merah muda dengan bintik hitam di tengah.

HE. : Koloni berwarna biru-hijau dengan atau tanpa bintik hitam di tengah.

SSA : Koloni tak berwarna sampai merah muda, bening sampai buram.

5.6.3.4.5 "Confirmation" atau penegasan (uji biokimia)

a. Pilih 5 koloni tersangka dan goreskan pada permukaan nutrient agar dalam cawan Petri yang sudah disiapkan terlebih dahulu dan inkubasikan pada suhu 37°C selama 20 – 24 jam.

b. Dari koloni yang diisiolasi pada Nutrient Agar, pindahkan ke dalam media sebagai berikut :

1. TSI Agar

   a. Tersangka koloni Salmonella dipindahkan ke Agar miring TSI dengan cara menggores bagian miringnya dan menusuk bagian tegaknya. Dari setiap cawan sebaiknya diambil lebih dari 2 koloni (1 koloni untuk agar miring).

   b. Inkubasikan pada suhu 37°C, selama 24 – 48 jam.

   c. Amati terjadinya perubahan-perubahan sebagai berikut :

   Pada bagian tegaknya Salmonela akan :

   * memfermentasikan glukosa, warna media berubah dari ungu menjadi kuning.
   * tidak memfermentasikan sakarosa media tetap ungu.
   * dapat membentuk gas H_2S, warna media berubah dari ungu menjadi hitam.

   Pada bagian miringnya Salmonela akan :

   * dapat memfermentasikan laktosa atau sakarosa warna media menjadi kuning.
   * tidak dapat memfermentasikan laktosa atau sakarosa, warna media tatap merah atau tidak berubah.

2. Urea Agar
   a. Goreskan tersangka koloni Salmonela pada permukaan urea agar miring.
   b. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Timbulnya warna merah muda menunjukkan reaksi positif dan warna tidak berubah reaksi negatif.

3. Lysine Decaboxylation Medium
   a. Inkubasikan tersangka koloni Salmonela pada perbenihan cair (Lysine Decarboxylase Broth).
   b. Imkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Timbulnya warna ungu menunjukkan reaksi positif.

4. Beta-Galactosidase Reagent
   a. Suspensikan tersangka koloni Salmonela dalam 0,25 ml larutan saline dalam tabung reaksi.
   b. Tambahkan 1 tetes toluena.
   c. Masukkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama beberapa menit.
   d. Tambahkan 0,25 ml pereaksi galactosidase dan kocok.
   e. Simpan lagi dalam penangas air pada suhu 37°C selama 24 jam. Terbentuknya warna kuning menunjukkan reaksi positif dan bila tidak berubah reaksi negatif.

5. V.P. Medium
   a. Masukkan masing-masing 1 sengkelit tersangka koloni Salmonela ke dalam 2 tabung reaksi yang masing-masing berisi 0,2 ml perbenihan VP.
   b. Inkubasikan tabung ke-1 pada suhu kamar dan tabung ke-2 suhu 37°C selama 48 jam.
   c. Kemudian pada tiap tabung tambahkan 2 tetes larutan creatine, 3 tetes larutan alphanaftol dan 2 tetes pereaksi KOH. Lakukan pengocokan tiap kali menambahkan pereaksi.
   d. Amati dalam waktu 15 menit. Terbentuknya warna merah jambu sampai merah tua menunjukkan reaksi positif dan bila tidak berubah reaksi negatif.

6. Indol Medium
   a. Masukkan 1 sengkelit tersangka Salmonela ke dalam media indol dalam tabung.
   b. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Tambahkan 1 ml pereaksi indol.
   c. Terbentuknya warna gelang merah menunjukkan reaksi positif dan bila tidak berubah atau warna kuning kecoklatan reaksi negatif.

Reaksi Biokimia dari Salmonela

a. TSI Agar
   Bagian tegaknya : Warna kuning dengan atau tanpa warna hitam (H_2S).
   Bagian miringnya : Warna merah atau tidak berubah.
b. Urea Agar : Warna tidak berubah (reaksi negatif).
c. Lysine decarboxylase : Warna ungu (reaksi positif).
d. Beta-Galactosidase : Warna tidak berubah (reaksi negatif).
e. Uji voges-Proskauer : Warna tidak berubah (reaksi negatif).
f. Uji indole : Warna kuning kecoklatan (reaksi negatif).

5.6.3.4.6 Uji Serologi

Ambil 1 sengkelit kultur dari TSI Agar dan oleskan pada gelas sediaan. Kemudian teteskan sedikit antisera di samping kultur. Dengan menggunakan sengkelit campur tetesan antisera dengan kultur hingga homogen. Penggumpalan yang terjadi menunjukkan uji positif. Jika reaksi biokimia menunjukkan adanya Salmonela dan uji serelogi positif, maka Salmonela dinyatakan positif.

6. SYARAT PENANDAAN

Pada label harus dicantumkan nama produk, berat bersih, lambang dan alamt produsen, jenis jasad renik, warna dan komposisi kasar (air, protein, abu, serat kasar, dan lemak).

7. CARA PENGEMASAN

Protein Sel Tunggal dikemas dalam wadah tertutup rapat tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.